

---

## 受賞講演総説

---

### 歯髄炎発症における自然免疫機構の役割と緑茶カテキンの 歯髄炎抑制効果の検討

平尾 功治

キーワード：自然免疫, TLR, NOD, 歯髄炎, カテキン

### Analyses of Innate Immune System and Anti-inflammatory Effect of Green Tea Catechin on Pulpitis

Kouji HIRAO

**Abstract :** Pulpitis, dental pulpal inflammation, is mainly associated with the dental caries-related pathogen invaded into dentinal tubules. Many types of cytokines and inflammatory mediators are induced for the initiation and progression of pulpitis. Among these cytokines and mediators, interleukin (IL)-6, IL-8, monocyte-chemoattractant protein (MCP)-1, interferon- $\gamma$ -inducible protein (IP)-10, prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>, are produced by inflamed human dental pulp fibroblasts (HDPFs). Generally, the initial sensing of microbial pathogens is mediated by pattern recognition receptors (PRRs) for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PRRs, such as toll-like receptor (TLR) and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD), are essential for the mammalian innate immune response. TLR2, TLR3, TLR4 and TLR5 expressions have been determined in HDPFs and their specific agonists can induce TLR-mediated inflammatory signals. Moreover, NOD1 and NOD2 expression are determined in dental pulp tissue and HDPFs. NOD2 is specifically responsible for cooperative effects with TLR2 agonists in HDPFs. Since dental pulpal inflammation is characterized as the immune response triggered by the invasion of caries-related bacteria into dentinal tubules, pathogen recognition by multiple PRRs engagement including TLR&NOD might constitute a key event for the onset of resulting exacerbated pulpal inflammatory response. Catechin, the polyphenolic compounds in green tea, reduces risks of oxidative stress, atherosclerosis, cancer and cardiovascular diseases therefore associated with many important health benefits. Especially, epicatechin-3-gallate (ECG) and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) are representative types of green tea catechin and shows strong bioactivity. We demonstrated that ECG and EGCG can inhibit some inflammatory cytokines production in HDPFs stimulated with PAMPs such as Pam3CSK4 (TLR2 specific ligand), LPS (TLR4 specific ligand) and MDP (NOD2 specific ligand). Moreover, ECG and EGCG inhibit the phosphorylations of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the activation of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B. Recently, it has been shown that the biological activities of EGCG are mediated through the binding to the cell-surface 67-kDa laminin receptor (67LR). However, there are no reports about the expression of 67LR on HDPFs. Anti-inflammatory effect of catechin is important for the development of new therapeutic strategies and treatments for dental pulpal inflammation.

## 1. はじめに

我々ヒトを含む哺乳類では、病原因子を特異的に認識して病原体を排除する獲得免疫がよく発達している。しかしながら、感染初期においては、広範な病原因子を認識する自然免疫が働き、宿主抵抗性に重要な役割を果たしている<sup>1,2)</sup>。自然免疫は、1996年に Hoffmann が、ショウジョウバエの形態形成の制御に関わる膜タンパク質 Toll が真菌に対する抵抗性に関与する事を発見したことに始まり<sup>3)</sup>、哺乳類においても Toll-Like Receptor (TLR) を介した同様の免疫機構が存在することを発見した Beutler<sup>4)</sup> とともに、2011年のノーベル生理学・医学賞を受賞したことは記憶に新しい。TLR は細菌の構成成分 (Pathogen Associated Molecular Patterns; PAMPs) を特異的に認識するレセプター分子 (Pattern Recognition Receptors; PRRs) であり、その後の研究によって、現在までに哺乳類において12の TLR が報告されている<sup>5-7)</sup>。各 TLR はそれぞれ病原体に特異的な構成成分を認識し、TLR2はペプチドグリカンやリポプロテイン、リポタイコ酸などを<sup>8,9)</sup>、TLR4は lipopolysaccharide (LPS) を認識する膜タンパク質である<sup>4,10)</sup>。これらのシグナルは、Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B ファミリーを活性化し炎症性サイトカインなどの免疫機構に関与する遺伝子群の発現を誘導する<sup>11,12)</sup>。また、宿主の細胞質内で PAMPs を認識するレセプターとして、Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)1, NOD2が知られている。NOD は TLR と同様に PAMPs 認識部位として Leucine-Rich Repeats (LRR) を持ち、NOD1は  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP) を、NOD2 は N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, muramyl dipeptide (MDP) といった細菌の細胞壁構成成分を認識する。また、NOD シグナルも同様に NF- $\kappa$ B の活性化を誘導する<sup>13-16)</sup>。

近年の超高齢化社会において、口腔機能の改善を通じて Quality of Life (QOL) を高めようとする取り組みが行われている。特に歯の喪失は QOL を著しく低下させるものである。歯を喪失する主な疾患としてう蝕と歯周病が挙げられるが、歯髄炎はう蝕に继发する感染症であり、早期に歯髄組織の不可逆性変化を引き起こし、歯髄除去療法の適応となる<sup>17)</sup>。しかしながら、歯髄を除去された歯は破折などの転機をたどることも少なくなく<sup>18)</sup>、その予後は必ずしも良好ではない。そのため、近年、歯髄保存の機運が高まっており、歯髄炎の病態の把握や歯髄保護材の開発が注目されている<sup>19)</sup>。

歯髄炎において、種々の細菌や細胞がう蝕に伴う歯髄の免疫反応に関与すると考えられている<sup>20-23)</sup>。歯髄炎が進行するに伴い、様々な炎症性メディエーターが産生され、これまでに、培養歯髄細胞において種々の炎症性刺激によって Interleukin (IL)-6, IL-8, Monocyte-Chemoattractant Protein (MCP)-1, Interferon- $\gamma$ -inducible Protein (IP)-10などの炎症性サイトカイン・ケモカ

イン<sup>24-27)</sup> や intercellular adhesion molecule (ICAM)-1<sup>28)</sup> の産生が増強されることが報告されている。また、炎症歯髄組織において Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> や inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) といった炎症性メディエーターの発現が報告されている<sup>29-31)</sup>。これらの報告は、様々な炎症性メディエーターが歯髄炎の進行に関与していることを示しており、その発症に自然免疫の関与が疑われる。

そこで本稿では、歯髄炎における自然免疫反応の役割とケモカインの抗炎症作用を応用した歯髄炎抑制効果について我々の基礎的研究を中心に解説する。

## 2. 歯髄組織における自然免疫反応

歯髄組織には、樹状細胞、マクロファージ、リンパ球といった免疫細胞が存在し、う蝕病巣からの細菌感染防御の一端を担っている<sup>32-34)</sup>。また、免疫細胞のみならず、歯髄組織の主要な構成成分である歯髄線維芽細胞も免疫応答に重要な役割を果たす<sup>35,36)</sup>。歯髄線維芽細胞は、種々の細菌やサイトカイン刺激によって C-C motif chemokine Ligand (CCL)20 や IP-10, IL-8 といったサイトカイン、ケモカイン、や NO, PGE<sub>2</sub> などの炎症性メディエーターを産生することが報告されている<sup>26,37,38)</sup>。さらに、ヒト歯髄線維芽細胞は TLR2, TLR3, TLR4, TLR5を発現し、各々の特異的なリガンド刺激により炎症性サイトカインを産生する<sup>25,39-41)</sup>。近年、免疫組織化学染色においてヒト歯髄組織には NOD1, NOD2が発現していることが報告されており、炎症歯髄組織においてはその発現が亢進している<sup>42-45)</sup>。また、我々は培養ヒト歯髄線維芽細胞が NOD1, NOD2を発現し、それぞれの特異的なリガンドである iE-DAP, MDP 刺激によって IL-8, IL-6, MCP-1などの炎症性サイトカインが産生誘導されることを報告している<sup>25)</sup>。

TLR シグナルと NOD シグナルは相互に作用し合い、その作用を増強させることが知られている<sup>46,47)</sup>。近年、Tang らは、歯根膜線維芽細胞において LPS と iE-DAP または MDP の共刺激により IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8の産生が相乗的に増加することを報告しており<sup>48)</sup>、我々も培養ヒト歯髄線維芽細胞において、TLR2特異的なリガンドである Pam3CSK4 と NOD2特異的なリガンドである MDP の同時刺激により、炎症性サイトカインの産生が相乗的に増加することを明らかにした。我々の研究では、LPS と MDP との相乗作用は認めず、相加的な効果に留まったが、これは歯髄線維芽細胞が TLR4 よりも TLR2をより優位に発現していたためであると考えられる。Mutoh らは、マウスの歯髄炎モデルにおいて細菌感染9時間後の歯髄組織にて、TLR2 mRNA 発現レベルが TLR4 mRNA 発現レベルより約30倍高く、また免疫組織化学染色において TLR4は象牙芽細胞層や免疫細胞に比較的多く発現していると報告している<sup>33)</sup>。これらのことから、歯髄線維芽細胞は主に TLR2を発現し、マクロファージや樹状細胞

胞，象牙芽細胞などがTLR4を発現しLPSの認識を担っていると考えられる。

う蝕が進行し歯髄へと近接するにつれ，グラム陽性好気性菌は減少し，グラム陰性嫌気性菌が増加することが知られており<sup>49)</sup>，歯髄組織は，これら様々な細菌からの刺激に対し，上述の様なTLR，NODなどのPRRsを発現，機能させて細菌感染に抵抗していることが示唆される。

### 3. 緑茶カテキンの生理活性

緑茶は広く摂取されている飲料であり，その生理作用として抗酸化作用，抗腫瘍作用，抗動脈硬化作用，抗菌作用などが知られている<sup>50-52)</sup>。これらの作用の活性成分に関する研究において，カテキンが注目されている。カテキンはポリフェノール類の一種であり，緑茶より抽出されるものとしては，epicatechin (EC)，epigallocatechin (EGC)，epicatechin-3-gallate (ECG)，epigallocatechin-3-gallate (EGCG) が知られている。このうち，ECGとEGCGには強い生理活性があることが報告されており，盛んに研究が行われている<sup>53, 54)</sup>。

カテキンの抗菌作用については，歯科分野においてもよく研究されており，*Streptococcus mutans* に対しては，増殖ならびにバイオフィルム形成の抑制や乳酸脱水素酵素活性の抑制が認められる他<sup>55)</sup>，EGCG溶液にて洗口後のプラーク内pHの上昇が報告されている<sup>56)</sup>。また，義歯性口内炎や日和見感染の原因菌である，*Candida albicans* に対してもEGCGは抗菌作用を発揮する<sup>57, 58)</sup>。*Porphyromonas gingivalis* は歯周病原菌として知られているが，EGCGはその病原因子の一つであるgingipain活性を抑制する<sup>59)</sup>。このように，う蝕や歯周病に対するカテキンの応用については報告されているが，これまでカテキンの歯髄炎に与える影響については研究されていない。

### 4. 歯髄炎に対するカテキンの抗炎症作用とその応用の可能性

前述の通り，カテキン，特にECG，EGCGは様々な生理活性作用を持ち，幅広く応用されている。Kimらは，鼻腔由来線維芽細胞ならびに肺胞由来上皮細胞株であるA549細胞において，ECGとEGCGはIL-1 $\beta$ 刺激によるIL-8産生を抑制することを報告している<sup>60)</sup>。また近年，EGCGはマウスの敗血症を抑制するとの報告や<sup>61)</sup>，LPSによる歯槽骨吸収を抑制するとの報告<sup>62)</sup>もあり，その抗炎症作用にも注目が集まっている。

様々な細菌因子がTLR，NODなどのPRRsによって認識されることにより歯髄炎が発症する。我々は，カテキンの抗炎症作用に着目し，歯髄炎発症を抑制するため，窩洞形成後の露髄面にカテキンを応用することを想定した。カテキンを飲料として摂取した場合，その血中濃度は摂取後1.5～2.5時間で最高に達し，その濃度は

1  $\mu$ M程度であるとされている<sup>63)</sup>。しかしながら，歯髄局所にカテキンを応用する場合，これより高い濃度での利用も可能であると考えられる。そこで，我々は培養ヒト歯髄線維芽細胞を用いて実験を行った<sup>64)</sup>。その結果，ECGやEGCG存在下でのヒト歯髄線維芽細胞の細胞増殖能は50  $\mu$ g/mlにて若干の減少が認められるものの，ほとんど影響を及ぼさないものと判断された。10または50  $\mu$ g/mlのECGやEGCG処理は細菌因子刺激下でのヒト歯髄線維芽細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制するが，一方で，不可逆性歯髄炎のマーカーと報告されているPGE<sub>2</sub><sup>29, 30)</sup>に関しては，EGCG 50  $\mu$ g/ml存在下で各種PAMPs刺激において産生量の増加が認められた。EGCGはPGE<sub>2</sub>産生を抑制するとの報告<sup>65, 66)</sup>もある一方で，産生経路の律速酵素であるCOX-2を増加させ，PGE<sub>2</sub>産生を促進させるとの報告もあり<sup>67)</sup>，EGCGはその細胞種や濃度によって異なる働きを持つ可能性があるとして議論されているところである<sup>68)</sup>。

PAMPsによるTLR刺激はMitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) やNF- $\kappa$ Bを活性化する<sup>69)</sup>。近年，TLR2やTLR4特異的リガンド刺激によるMAPKのリン酸化を1  $\mu$ M程度の低濃度のEGCGが抑制し，抗炎症作用を発揮するとの報告が相次いでなされた<sup>70, 71)</sup>。我々もヒト歯髄線維芽細胞においてPam3CSK4刺激はp38 MAPK, c-jun NH2-terminal kinase (SAP/JNK)，Extracellular signal Regulated Kinase (ERK) 1/2といったMAPK familyをリン酸化し，50  $\mu$ g/mlと高濃度のECGやEGCGがこれらのリン酸化を抑制すること，また同様にInhibitor  $\kappa$ B (IkB)  $\alpha$ のリン酸化やNF- $\kappa$ B p65のリン酸化も抑制し，最終的にNF- $\kappa$ Bの活性化も抑制することを報告している。

### 5. カテキンの生理作用のメカニズム

TachibanaらはEGCGと67-kDaラミニンレセプター(67LR)が結合する可能性があることを報告している<sup>72)</sup>。67LRは基底膜の重要な構成成分であるラミニンに結合する細胞膜タンパクであり，腫瘍細胞の転移や浸潤に関与することが知られている<sup>73)</sup>。腫瘍細胞株であるB16やCaco-2は，1  $\mu$ MのEGCGによってその細胞増殖が顕著に抑制される。また，それら細胞株の67LRの発現をRNAiにより抑制すると，EGCGの抗腫瘍効果は認められなくなる<sup>74, 75)</sup>。抗アレルギー作用においても同様に67LRの発現を抑制することで，EGCGのヒスタミン放出抑制作用やIgE受容体発現抑制作用を阻害する<sup>76, 77)</sup>。また，抗炎症作用においてもEGCGは67LRを介してMAPKのリン酸化を阻害することが報告されている<sup>70, 71)</sup>。

しかしながら，我々はヒト歯髄線維芽細胞において67LRの発現を見いだせておらず，またヒト線維肉腫細胞株(HT1080)において67LRの発現の報告はあるものの<sup>78)</sup>，正常線維芽細胞において67LRの発現は報告され



ていない。さらに、我々の別の報告において、ヒト歯髄線維芽細胞は低濃度 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) の ECG や EGCG ではわずかな抗炎症作用しか認めなかった<sup>79)</sup>。これらの結果は、カテキンの生理作用は細胞種やその濃度によって作用機序が異なる可能性を示唆している。近年、カテキンやポリフェノール類が脂質二重膜に結合するとの報告がなされており<sup>80)</sup>、ECG や EGCG の細胞膜表面への非特異的な吸着が、PRRs の PAMPs 認識を阻害する可能性があり、今後の研究の発展が望まれる。

## 6. おわりに

歯髄炎は、う蝕からの細菌刺激により歯髄細胞が自然免疫応答を引き起こし、炎症反応が惹起されることで発症し、病態の進行に伴い歯髄組織の不可逆性変化が早期に引き起こされる。これは、各 PRRs が多種の PAMPs を認識することで相乗作用を引き起こすことも一因と考えられる。今回、歯髄炎発症抑制の可能性を探る目的で緑茶カテキンに着目し、その主要成分である ECG や EGCG にはヒト培養歯髄細胞に対し強い抗炎症作用があることが明らかとなった。しかし、そのメカニズムについては不明な点も多く、今後の臨床応用に向けて *in vivo* での歯髄炎抑制効果の解析と、*in vitro* での作用機序の詳細な解明が待たれるところである。

## 参考文献

- 1) de Villartay JP, Fischer A, and Durandy A: The mechanisms of immune diversification and their disorders. *Nat Rev Immunol* 3, 962-972 (2003)
- 2) Janeway CA, Jr. and Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216 (2002)
- 3) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, and Hoffmann JA: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983 (1996)
- 4) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, and Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282, 2085-2088 (1998)
- 5) Akira S, Takeda K, and Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680 (2001)
- 6) Akira S, Uematsu S, and Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801 (2006)
- 7) Beutler BA: TLRs and innate immunity. *Blood* 113, 1399-1407 (2009)
- 8) Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, and Kirschning CJ: Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274, 17406-17409 (1999)
- 9) Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, and Zychlinsky A: Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285, 736-739 (1999)
- 10) Takeda K and Akira S: Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17, 1-14 (2005)
- 11) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, and Akira S: Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324-329 (2002)
- 12) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, and Akira S: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643 (2003)
- 13) Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nunez G, and Inohara N: An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4, 702-707 (2003)
- 14) Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, and Philpott DJ: Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300, 1584-1587 (2003)
- 15) Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, and Sansonetti PJ: Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278, 8869-8872 (2003)
- 16) Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, and Nunez G: Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278, 5509-5512 (2003)
- 17) Tronstad L and Mjor IA: Capping of the inflamed pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 34, 477-485 (1972)
- 18) Cohen S, Berman LH, Blanco L, Bakland L, and Kim JS: A demographic analysis of vertical root fractures. *J Endod* 32, 1160-1163 (2006)
- 19) Witherspoon DE: Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives--permanent teeth. *J Endod* 34, S25-28 (2008)
- 20) Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, and Sakai H:

- Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. *Arch Oral Biol* 40, 609-614 (1995)
- 21) Hahn CL, Best AM, and Tew JG: Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun* 68, 6785-6789 (2000)
- 22) Hahn CL and Liewehr FR: Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod* 33, 773-781 (2007)
- 23) Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, and Hunter N: Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol* 40, 1698-1704 (2002)
- 24) Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, Taketoshi Y, Tamura M, Takada H, and Kawagoe M: Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod* 22, 9-12 (1996)
- 25) Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Mukai K, Nakanishi T, and Matsuo T: Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts. *J Dent Res* 88, 762-767 (2009)
- 26) Adachi T, Nakanishi T, Yumoto H, Hirao K, Takahashi K, Mukai K, Nakae H, and Matsuo T: Caries-related bacteria and cytokines induce CXCL10 in dental pulp. *J Dent Res* 86, 1217-1222 (2007)
- 27) Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, Torii M, and Nagaoka S: Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod* 27, 273-277 (2001)
- 28) Bagis B, Atilla P, Cakar N, and Hasanreisoglu U: Immunohistochemical evaluation of endothelial cell adhesion molecules in human dental pulp: effects of tooth preparation and adhesive application. *Arch Oral Biol* 52, 705-711 (2007)
- 29) Nakanishi T, Matsuo T, and Ebisu S: Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps. *J Endod* 21, 131-136 (1995)
- 30) Nakanishi T, Shimizu H, Hosokawa Y, and Matsuo T: An immunohistological study on cyclooxygenase-2 in human dental pulp. *J Endod* 27, 385-388 (2001)
- 31) Di Nardo Di Maio F, Lohinai Z, D'Arcangelo C, De Fazio PE, Speranza L, De Lutiis MA, Patruno A, Grilli A, and Felaco M: Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp. *J Dent Res* 83, 312-316 (2004)
- 32) Jontell M, Gunraj MN, and Bergenholtz G: Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res* 66, 1149-1153 (1987)
- 33) Mutoh N, Tani-Ishii N, Tsukinoki K, Chieda K, and Watanabe K: Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp. *J Endod* 33, 1183-1186 (2007)
- 34) Hahn CL, Falkler WA, Jr., and Siegel MA: A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endod* 15, 20-26 (1989)
- 35) Warfvinge J: Morphometric analysis of teeth with inflamed pulp. *J Dent Res* 66, 78-83 (1987)
- 36) Glick M, Trope M, Bagasra O, and Pliskin ME: Human immunodeficiency virus infection of fibroblasts of dental pulp in seropositive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 71, 733-736 (1991)
- 37) Takahashi K, Nakanishi T, Yumoto H, Adachi T, and Matsuo T: CCL20 production is induced in human dental pulp upon stimulation by *Streptococcus mutans* and proinflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol* 23, 320-327 (2008)
- 38) Sipert CR, Moraes IG, Bernardinelli N, Garcia RB, Bramante CM, Gasparoto TH, Figueira EA, Dionisio TJ, Campanelli AP, Oliveira SH, Cunha FQ, and Santos CF: Heat-killed *Enterococcus faecalis* alters nitric oxide and CXCL12 production but not CXCL8 and CCL3 production by cultured human dental pulp fibroblasts. *J Endod* 36, 91-94 (2010)
- 39) Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, Romeas A, Vincent C, Bleicher F, Lebecque S, and Farges JC: Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *J Dent Res* 87, 256-261 (2008)
- 40) Keller JF, Carrouel F, Colomb E, Durand SH, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, Vincent C, Staquet MJ, and Farges JC: Toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid induces differential production of pro-inflammatory cytokines in human odontoblasts, dental pulp fibroblasts and immature dendritic cells. *Immunobiology* 215, 53-59 (2010)
- 41) Park C, Lee SY, Kim HJ, Park K, Kim JS, and Lee SJ: Synergy of TLR2 and H1R on Cox-2 Activation in Pulpal Cells. *J Dent Res* 89, 180-185 (2010)
- 42) Lin ZM, Song Z, Qin W, Li J, Li WJ, Zhu HY, and Zhang L: Expression of nucleotide-binding oligomerization domain 2 in normal human dental pulp cells and dental pulp tissues. *J Endod* 35, 838-842 (2009)
- 43) Lee YY, Chan CH, Hung SL, Chen YC, Lee YH, and Yang SF: Up-regulation of nucleotide-binding oligomerization domain 1 in inflamed human dental pulp. *J Endod* 37, 1370-1375 (2011)
- 44) Staquet MJ, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, Kufer TA, and Farges JC: Pattern-recognition receptors in pulp defense. *Adv Dent Res* 23, 296-301 (2011)
- 45) Keller JF, Carrouel F, Staquet MJ, Kufer TA, Baudouin

- C, Msika P, Bleicher F, and Farges JC: Expression of NOD2 is increased in inflamed human dental pulps and lipoteichoic acid-stimulated odontoblast-like cells. *Innate Immun* 17, 29-34 (2011)
- 46) Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M, Cavaillon JM, Philpott DJ, and Adib-Conquy M: Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol* 35, 2459-2470 (2005)
  - 47) Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Jansen T, Jacobs L, Kramer M, Naber TH, Drenth JP, Girardin SE, Kullberg BJ, Adema GJ, and Van der Meer JW: Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J Immunol* 174, 6518-6523 (2005)
  - 48) Tang L, Zhou XD, Wang Q, Zhang L, Wang Y, Li XY, and Huang DM: Expression of TRAF6 and pro-inflammatory cytokines through activation of TLR2, TLR4, NOD1, and NOD2 in human periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol* 56, 1064-1072 (2011)
  - 49) Hoshino E: Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent Res* 64, 1195-1198 (1985)
  - 50) Frei B and Higdon JV: Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 133, 3275S-3284S (2003)
  - 51) Vita JA: Tea consumption and cardiovascular disease: effects on endothelial function. *J Nutr* 133, 3293S-3297S (2003)
  - 52) Crespy V and Williamson G: A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J Nutr* 134, 3431S-3440S (2004)
  - 53) Henning SM, Choo JJ, and Heber D: Nongallated compared with gallated flavan-3-ols in green and black tea are more bioavailable. *J Nutr* 138, 1529S-1534S (2008)
  - 54) Mabe K, Yamada M, Oguni I, and Takahashi T: In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1788-1791 (1999)
  - 55) Xu X, Zhou XD, and Wu CD: The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 1229-1236 (2011)
  - 56) Hirasawa M, Takada K, and Otake S: Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. *Caries Res* 40, 265-270 (2006)
  - 57) Sittheekue MA, Panagoda GJ, Yau J, Amarakoon AM, Udagama UR, and Samaranayake LP: Antifungal activity of black tea polyphenols (catechins and theaflavins) against *Candida* species. *Chemotherapy* 55, 189-196 (2009)
  - 58) Evensen NA and Braun PC: The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Can J Microbiol* 55, 1033-1039 (2009)
  - 59) Okamoto M, Sugimoto A, Leung KP, Nakayama K, Kamaguchi A, and Maeda N: Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 19, 118-120 (2004)
  - 60) Kim IB, Kim DY, Lee SJ, Sun MJ, Lee MS, Li H, Cho JJ, and Park CS: Inhibition of IL-8 production by green tea polyphenols in human nasal fibroblasts and A549 epithelial cells. *Biol Pharm Bull* 29, 1120-1125 (2006)
  - 61) Li W, Ashok M, Li J, Yang H, Sama AE, and Wang H: A major ingredient of green tea rescues mice from lethal sepsis partly by inhibiting HMGB1. *PLoS One* 2, e1153 (2007)
  - 62) Nakamura H, Ukai T, Yoshimura A, Kozuka Y, Yoshioka H, Yoshinaga Y, Abe Y, and Hara Y: Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorption in vivo. *J Periodontol Res* 45, 23-30 (2010)
  - 63) Chow HH, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, Dorr RT, Hara Y, and Alberts DS: Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 9, 3312-3319 (2003)
  - 64) Hirao K, Yumoto H, Nakanishi T, Mukai K, Takahashi K, Takegawa D, and Matsuo T: Tea catechins reduce inflammatory reactions via mitogen-activated protein kinase pathways in toll-like receptor 2 ligand-stimulated dental pulp cells. *Life Sci* 86, 654-660 (2010)
  - 65) Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, and Haqqi TM: Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 33, 1097-1105 (2002)
  - 66) Peng G, Dixon DA, Muga SJ, Smith TJ, and Wargovich MJ: Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. *Mol Carcinog* 45, 309-319 (2006)
  - 67) Park JW, Choi YJ, Suh SI, and Kwon TK: Involvement of ERK and protein tyrosine phosphatase signaling pathways in EGCG-induced cyclooxygenase-2 expression in Raw 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 721-725 (2001)
  - 68) Kim SJ, Jeong HJ, Lee KM, Myung NY, An NH, Yang WM, Park SK, Lee HJ, Hong SH, Kim HM, and Um

- JY: Epigallocatechin-3-gallate suppresses NF-kappaB activation and phosphorylation of p38 MAPK and JNK in human astrocytoma U373MG cells. *J Nutr Biochem* 18, 587-596 (2007)
- 69) Li X, Jiang S, and Tapping RI: Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* 49, 1-9 (2010)
- 70) Hong Byun E, Fujimura Y, Yamada K, and Tachibana H: TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. *J Immunol* 185, 33-45 (2010)
- 71) Byun EH, Omura T, Yamada K, and Tachibana H: Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TLR2 signaling induced by peptidoglycan through the polyphenol sensing molecule 67-kDa laminin receptor. *FEBS Lett* 585, 814-820 (2011)
- 72) Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, and Yamada K: A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol* 11, 380-381 (2004)
- 73) Menard S, Castronovo V, Tagliabue E, and Sobel ME: New insights into the metastasis-associated 67 kD laminin receptor. *J Cell Biochem* 67, 155-165 (1997)
- 74) Umeda D, Yano S, Yamada K, and Tachibana H: Involvement of 67-kDa laminin receptor-mediated myosin phosphatase activation in antiproliferative effect of epigallocatechin-3-O-gallate at a physiological concentration on Caco-2 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 371, 172-176 (2008)
- 75) Umeda D, Yano S, Yamada K, and Tachibana H: Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *J Biol Chem* 283, 3050-3058 (2008)
- 76) Fujimura Y, Umeda D, Kiyohara Y, Sunada Y, Yamada K, and Tachibana H: The involvement of the 67 kDa laminin receptor-mediated modulation of cytoskeleton in the degranulation inhibition induced by epigallocatechin-3-O-gallate. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 524-531 (2006)
- 77) Fujimura Y, Yamada K, and Tachibana H: A lipid raft-associated 67kDa laminin receptor mediates suppressive effect of epigallocatechin-3-O-gallate on FcepsilonRI expression. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 674-681 (2005)
- 78) Zuber C, Knackmuss S, Zemora G, Reusch U, Vlasova E, Diehl D, Mick V, Hoffmann K, Nikles D, Frohlich T, Arnold GJ, Brenig B, Wolf E, Lahm H, Little M, and Weiss S: Invasion of tumorigenic HT1080 cells is impeded by blocking or downregulating the 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *J Mol Biol* 378, 530-539 (2008)
- 79) Nakanishi T, Mukai K, Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, and Matsuo T: Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *Eur J Oral Sci* 118, 145-150 (2010)
- 80) Kamihira M, Nakazawa H, Kira A, Mizutani Y, Nakamura M, and Nakayama T: Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated by a quartz-crystal microbalance analysis. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 1372-1375 (2008)